

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350524

研究課題名(和文) ナノマテリアルに対する特異的受容体の同定

研究課題名(英文) Identification of the specific receptors for the nanomaterials

研究代表者

薄井 雄企 (USUI, Yuki)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：00467169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の培養培地を変える事によってMWCNTに対する細胞の生物応答、特に細胞内の取り込みに影響を与える細胞膜レセプターの発現が変化することを明らかにした。この取り込みはクラスリン依存性エンドサイトーシスだけでなく、カベオリン依存性エンドサイトーシス、マクロピノサイトーシスも関与していた。変化した細胞膜レセプターはITGB1やMARCOであることをRT-PCRで確認した。エンドサイトーシスで取り込まれたMWCNTはオートファジーのマーカーであるLC3Bの発現を誘導し、細胞増殖を抑制した。

研究成果の概要(英文)：The culture medium composition affected the proteins that are expressed on the cytoplasmic membrane, which influence the biological response to MWCNTs, especially its cellular uptake. MWCNTs were positively taken up by nonphagocytic cells, and their cytotoxicity was closely related to these three endocytosis pathways (clathrin-mediated, caveolae-mediated, and macropinocytosis). ITGB1 and MARCO may related to receptor-mediated endocytosis of MWCNTs in the nonphagocytic cells. The MWCNTs-endocytosed cells induced LC3B expression and induced cell growth inhibition.

研究分野：生体材料学

キーワード：生体物性 ナノマテリアル カーボンナノチューブ エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

(1) カーボンナノチューブ (CNT) は2年前にノーベル化学賞の対象となった炭素でできたグラフェンシートを筒状にした繊維状の物質であり、多層 CNT (MWCNT) はその物性から石油採掘現場からバッテリーの開発まで様々な方面で研究開発が行われており、信州大学ではカーボン科学研究所を設置して、その産業応用のための研究を行っている。

(2) その一つの分野として医療応用のプロジェクトがあり、我々は整形外科分野におけるインプラント複合材料としての可能性を検討しており、すでに2009年に Chem Soc Rev で報告している。

(3) CNT の生理作用は細胞内に取り込まれて作用することが多いが、その量が多くなりすぎると細胞障害性が現れる (Int J Nanomed 2011a)。しかし、この細胞内取り込みはすべての細胞でみられるわけではなく、細胞種によって全く異なり、THP-1 ヒト単球性白血病細胞ではマクロファージに分化させるとそれまで取り込まなかった細胞が CNT を貪食するようになる (図 1; Int J Nanomed 2011b)。

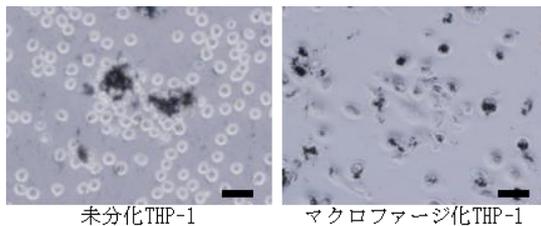


図 1. 分化状態の異なる細胞では CNT の取り込みが異なり、取り込まれなかった CNT は細胞外に凝集(左図)

(4) 既知の報告ではナノマテリアルの細胞内取り込みは3通りであり、1 μ m以下のナノマテリアルは細胞膜を受動的に拡散、凝集体はファゴサイトーシス、そして、それ以外は受容体介在エンドサイトーシスであるとした。しかし、細胞の状態による違いの報告はなく、細胞の CNT を含むナノマテリアルの取り込みには未知の能動的なメカニズムがあると考えられる。

2. 研究の目的

我々はこれまでに明らかになっていない CNT の細胞内での取り込みのメカニズムとその受容体を本研究課題で明らかにする。

3. 研究の方法

(1) MWCNT の調製

MWCNT は保土ヶ谷化学工業製の MWNT-7 を用い、分散剤は 0.1% gelatin、または 2% ウシ胎児血清 (FBS) を用いた。MWCNT 濃度は 10 mg/ml とし、水槽式超音波処理装置で 30 min 分散処理を行った。各実験では必要に応じて

分散剤で希釈後、終濃度になるように暴露した。

(2) 細胞の分化状態による CNT に対するバイオレスポンス

セルラインである BEAS-2B ヒト気管支上皮細胞とヒト正常気管支上皮細胞 (HBEpC) を血清入り培地 (Ham's F-12) と無血清培地 (SFGM) で培養し、CNT による細胞毒性、細胞内取り込み、サイトカイン分泌に違いがあるかを調べた。

(3) CNT 取り込みに関与するエンドサイトーシスの種類

ヒト中皮細胞 (HMCs)、そしてセルラインの BEAS-2B と MESO-1 ヒト悪性中皮腫細胞を用い、エンドサイトーシスのインヒビターによる CNT の細胞内取り込み経路を調べた。

(4) CNT レセプター候補の検証

これまでの CNT に対する細胞の取り込みの結果をもとにプロテオミクスによる CNT レセプターの同定と受容体介在エンドサイトーシスの受容体候補の発現比較を行った。

(5) 細胞内 CNT による細胞応答

細胞内に取り込まれた CNT のバイオレスポンスのメカニズムを調べた。

4. 研究成果

(1) 細胞の分化状態による CNT に対するバイオレスポンス

①細胞毒性

SFGM で培養した HBEpC と BEAS-2B を CNT に暴露したところ、図 2A のように明らかに CNT に対する感受性の違いが見られた。さらに BEAS-2B は Ham's F-12 で培養した場合、比較したところ、FBS が入っている場合、BEAS-2B は HBEpC と同様の細胞毒性を示すことが明らかになった (図 2B)。

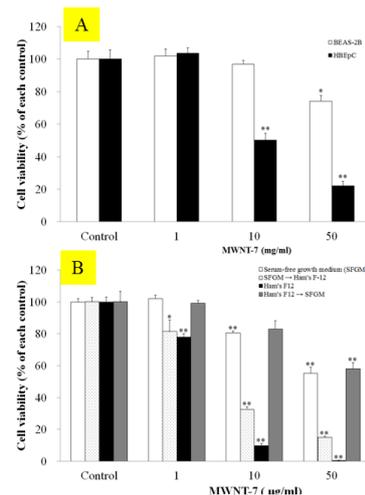


図 2. CNT 暴露ヒト気管支上皮細胞系の細胞毒性

②細胞内取り込み

細胞毒性で調べた条件の細胞の形体を観察したところ、CNT による細胞毒性が強くなった Ham's F-12 で培養された BEAS-2B と

SFGM で培養された HBEpC では CNT が細胞内に取り込まれていたのに対し、SFGM で培養された BEAS-2B は細胞表面にほとんどの CNT が接着しているのみであり、取り込まれているものはわずかであった (図 3)。

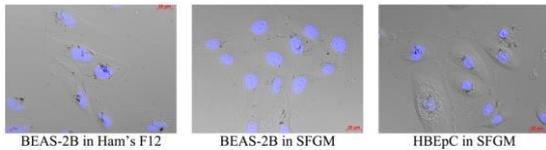


図 3. CNT 暴露細胞の CNT の取り込み

③ サイトカインの分泌

CNT 暴露によるサイトカインの分泌を調べたところ、CNT の取り込みが見られた Ham's F-12 で培養された BEAS-2B と SFGM で培養された HBEpC では IL-6 と IL-8 の分泌が増加したのに対し、SFGM で培養された BEAS-2B はほとんど変化しなかった (図 4)。

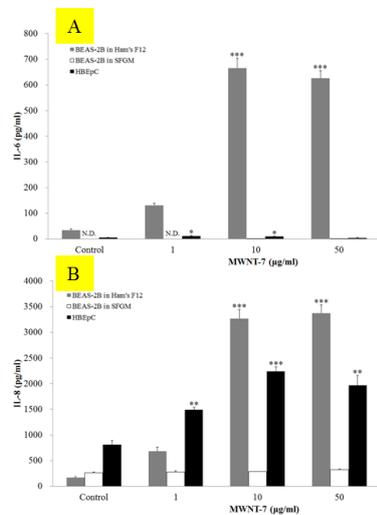


図 4. CNT 暴露によるサイトカインの分泌

(2) CNT 取り込みに関与するエンドサイトーシスの種類

① CNT の HMC 暴露

前述した HBEpC 同様、ヒトの HMC で CNT の取り込みがあるかをまず確認した。CNT の取り込みとそれに伴う細胞毒性が示された (図 5)。

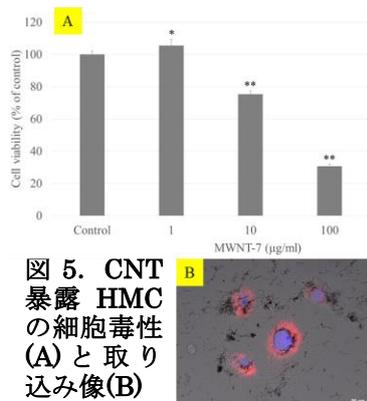


図 5. CNT 暴露 HMC の細胞毒性 (A) と取り込み像 (B)

② 正常のヒト肺関連細胞で CNT の取り込みが確認されたことから、セルラインである BEAS-2B と MESO-1 でどのようなエンドサイトーシスが関わっているかを各阻害剤を使って調べた (図 6)。

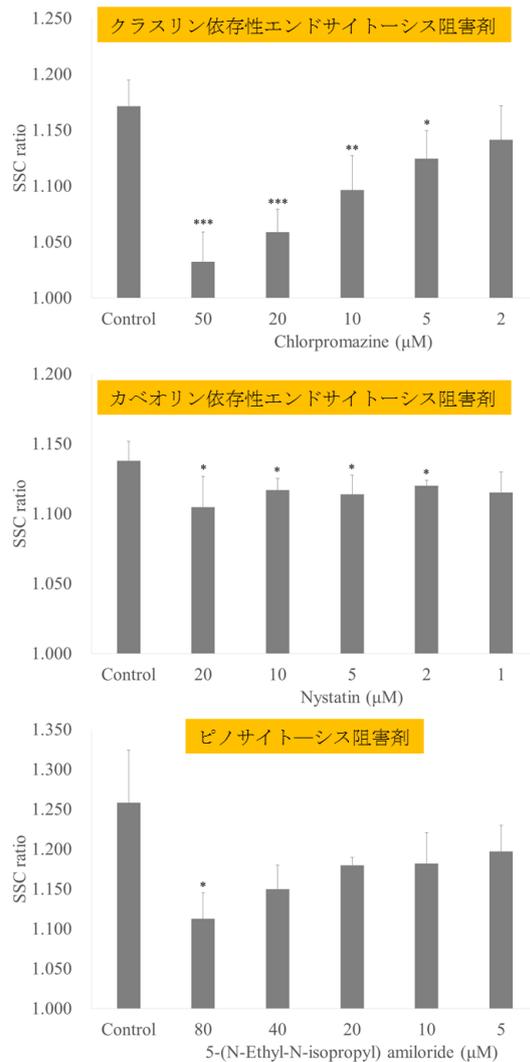


図 6. エンドサイトーシス阻害剤による MESO-1 の CNT の取り込み変化

その結果、クラスリン依存性エンドサイトーシスが最も CNT の取り込みに関与している事が示されたが、他のカベオリン依存性エンドサイトーシス、およびピノサイトーシスのどちらも若干は関与している結果が得られ、CNT の取り込みは各種のエンドサイトーシスがそれぞれに関与している事が明らかとなった。また、MESO-1 と BEAS-2B による明確な差はなかった。

(3) CNT レセプター候補の検証

これまでに明らかになった細胞種による CNT の取り込み差の違いをもとに、各細胞のプロテオミクス分析を行い、取り込み細胞で発現量が多い膜タンパク質をピックアップしたところ、インテグリン $\beta 1$ がその候補としてリストアップされた。我々はこの ITGB1 と他にナノマテリアルのレセプターといわれている MARCO、及び EGFR を前述した異なる血清の有無で CNT の取り込みが変化した BEAS-2B の mRNA 発現で比較した。その結果、MARCO と ITGB1 は CNT を取り込む状態の細胞で発現が亢進していた (図 7)。

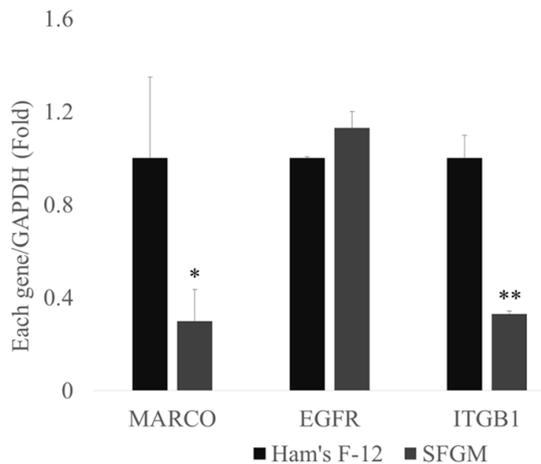


図 7. 膜タンパク質の発現比

(4) 細胞内 CNT による細胞応答

エンドサイトーシスによって取り込まれた CNT の細胞毒性を示す時のメカニズムがオートファジーであるかを調べた。その結果、CNT はオートファジーのマーカーである light-chain 3B(LC3B)を誘導しており、CNT の細胞障害性はオートファジーによることが明らかとなった(図 8)。

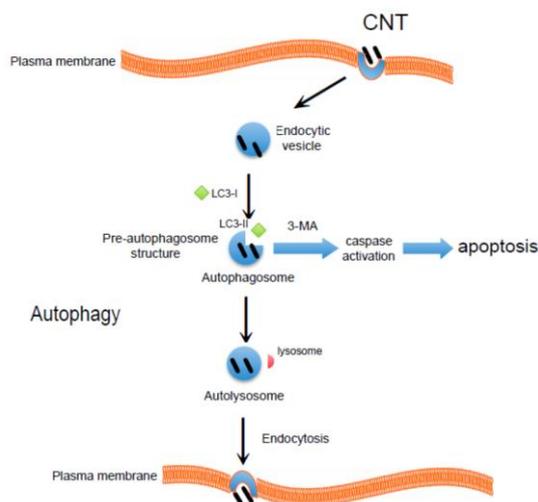


図 8. CNT による細胞障害性のメカニズム

【総括】

CNT の細胞の取り込みは細胞の種類や分化状態によって違いがあり、その経路は特定のエンドサイトーシスによるものではなかった。また、受容体依存性エンドサイトーシスに関しても、MARCO や ITGB1 など複数の受容体が関与していることが明らかとなった。そして、このようなエンドサイトーシスによって取り込まれた CNT による細胞障害性はオートファゴサイトーシスによるものであった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

① Tsukahara T, Matsuda Y, Haniu H. The Role of Autophagy as a Mechanism of Toxicity Induced by Multi-Walled Carbon Nanotubes in Human Lung Cells. *Int J Mol Sci*. 2015; 16: 40-8. 査読有

② Nomura H, Takanashi S, Tanaka M, Haniu H, Aoki K, Okamoto M, Kobayashi S, Takizawa T, Usui Y, Oishi A, Kato H, Saito N. Specific biological responses of the synovial membrane to carbon nanotubes. *Sci Rep*. 2015;5: 14314. 査読有

③ Kobayashi S, Tsuruoka S, Usui Y, Haniu H, Aoki K, Takanashi S, Okamoto M, Nomura H, Tanaka M, Aiso S, Saito M, Kato H, Saito N. An advanced in situ imaging method using heavy metal-doped hollow tubes to evaluate the biokinetics of carbon nanotubes in vivo. *NPG Asia Mater*. 2015;7:e203. 査読有

④ Maruyama K, Haniu H, Saito N, Matsuda Y, Tsukahara T, Kobayashi S, Tanaka M, Aoki K, Takanashi S, Okamoto M, Kato H. Endocytosis of multiwalled carbon nanotubes in bronchial epithelial and mesothelial Cells. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 793186. 査読有

⑤ Saito N, Haniu H, Usui Y, Aoki K, Hara K, Takanashi S, Shimizu M, Narita N, Okamoto M, Kobayashi S, Nomura H, Kato H, Nishimura N, Taruta S, Endo M. Safe clinical use of carbon nanotubes as innovative biomaterials. *Chem Rev*. 2014; 114: 6040-79. 査読有

⑥ Haniu H, Saito N, Matsuda Y, Tsukahara T, Usui Y, Maruyama K, Takanashi S, Aoki K, Kobayashi S, Nomura H, Tanaka M, Okamoto M, Kato H. Biological responses according to the shape and size of carbon nanotubes in BEAS-2B and MESO-1 cells. *Int J Nanomedicine*. 2014; 9: 1979-90. 査読有

⑦ Tsukahara T, Matsuda Y, Usui Y, Haniu H. Highly purified, multi-wall carbon nanotubes induce light-chain 3B expression in human lung cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 440: 348-53. 査読有

⑧ Haniu H, Saito N, Matsuda Y, Tsukahara T, Maruyama K, Usui Y, Aoki K, Takanashi S, Kobayashi S, Nomura H, Okamoto M, Shimizu M, Kato H. Culture medium type affects endocytosis of multi-walled carbon nanotubes in BEAS-2B cells and subsequent biological response. *Toxicol In Vitro*. 2013; 27: 1679-85. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

① Haniu H. Effect of multi-walled carbon nanotubes in three different dispersants on MC3T3-E1 cell line proliferation. 5th International Conference on Nanotek & Expo, San Antonio, USA. November 16-18, 2015

② Tanaka M, Saito N, Zhang M, Sato Y, Haniu H.

Takizawa T, Nomura H, Kobayashi S, Okamoto M, Takanashi S, Aoki K, Usui Y, Kato H. A capacity of porous multi-walled carbon nanotube blocks as scaffold of bone regeneration. 12th Bone Biology Forum, Chiba, Japan, August 3, 2015

③Tanaka M, Saito N, Zhang M, Sato Y, Haniu H, Takizawa T, Nomura H, Kobayashi S, Okamoto M, Takanashi S, Aoki K, Usui Y, Kato H. The effect of carbon nanotube blocks on bone regeneration. Sixth Symposium on Carbon Nanomaterials Biology, Medicine & Toxicology, Nagoya, Japan, June 28, 2015

④Haniu H, Saito N, Maruyama K, Matsuda N, Tanaka M, Aoki K, Okamoto M, Kobayashi S, Nomura H, Takizawa T, Ohishi A, Usui Y, Kato H. Evaluation of Multi-walled Carbon Nanotubes Using the MC3T3-E1 Cell Line. TechConnect World Innovation Conference & Expo-2015, Washinton, DC, USA, June 14-17, 2015.

⑤野村博紀, 羽二生久夫, 高梨誠司, 小林伸輔, 青木薫, 丸山佳与, 薄井雄企, 加藤博之, 齋藤直人. ラット膝関節内における多層カーボンナノチューブの生体応答. 第 41 回日本毒性学会学術年会, 神戸, 2014.7.2-4

⑥丸山佳与, 羽二生久夫, 薄井雄企, 青木薫, 高梨誠司, 岡本正則, 小林伸輔, 野村博紀, 田中学, 松田佳和, 加藤博之, 齋藤直人. BEAS-2B 細胞の多層カーボンナノチューブの取り込み. 第 41 回日本毒性学会学術年会, 神戸, 2014.7.2-4.

⑦Haniu H, Saito N, Matsuda N, Maruyama K, Tsukahara T, Usui Y, Takanashi S, Aoki K, Kobayashi S, Nomura H, Okamoto M, Shimizu M, Kato H. Endocytosis of MWCNT in BEAS-2B cells are affected by the culture medium type. 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health, Nagoya, Japan, October 28-31, 2013.

⑧Kobayashi S, Tsuruoka S, Usui Y, Haniu H, Aoki K, Shimizu M, Takanashi S, Okamoto M, Kato H, Saito N. An innovative method to evaluate biodistribution and kinetics of carbon nanotubes using CNT peapods. 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health, Nagoya, Japan, October 28-31, 2013.

⑨Aoki K, Haniu H, Shimizu M, Takanashi S, Okamoto M, Kobayashi S, Nomura H, Usui Y, Kato H, Saito N. Drug delivery system by carbon nanotubes for sarcoma cells. 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health, Nagoya, Japan, October 28-31, 2013.

⑩Nomura H, Haniu H, Takanashi S, Kobayashi S, Okamoto M, Aoki K, Maruyama K, Usui Y, Kato H, Saito N. Intraarticular reaction and secretion of inflammatory chemokines to Multi wall carbon nanotubes. 6th International

Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health, Nagoya, Japan, October 28-31, 2013.

⑪羽二生久夫, 齋藤直人, 松田佳和, 丸山佳与, 薄井雄企, 青木薫, 高梨誠司, 小林伸輔, 野村博紀, 岡本正則, 清水政幸, 加藤博之. 培養液による多層カーボンナノチューブの BEAS-2B 細胞におけるバイオレスポンスへの影響. 第 40 回日本毒性学会学術年会, 千葉, 2013.6.17-19.

6. 研究組織

(1)研究代表者

薄井 雄企 (USUI, Yuki)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：00467169

(2)研究分担者

羽二生 久夫 (HANIU, Hisao)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：30252050

塚原 完 (TSUKAHARA, Tamotsu)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：00529943

(3)連携研究者

齋藤 直人 (SAITO, Naoto)

信州大学・学術研究院保健学系・教授

研究者番号：80283258

小林 伸輔 (KOBAYASHI, Shinsuke)

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40624705

(平成 27 年 6 月まで連携研究者)

野村 博紀 (NOMURA, Hiroki)

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40646543

(平成 27 年 10 月まで連携研究者)